

微脉冲半导体激光对兔视网膜损伤的实验研究

何晓静 陈雪艺 钱一 胡汉华

【摘要】 目的 初步研究微脉冲半导体激光对兔视网膜损伤的生物学效应。**方法** 8 只有色兔 (16 眼) 中每只眼的上、下方视网膜随机分别行 810nm 半导体激光连续波阈值光凝及微脉冲阈下光凝, 于光凝后即刻观察光斑反应和眼底荧光造影后荧光素渗漏情况, 并在光镜和电镜下观察其对视网膜和脉络膜造成的组织学改变。**结果** 微脉冲激光阈下光凝后光斑不可见, 亦无荧光素渗漏, 视网膜损伤不明显; 阈值光凝后可见光斑反应并有荧光素渗漏, 视网膜损伤明显, 外核层细胞数量减少, 内、外核层均出现少量核固缩和胞浆空泡化, 视网膜色素上皮细胞增生, Bruch 膜完整无损。**结论** 微脉冲激光光凝视网膜不会损伤视网膜, 但确定阈能量时要从低能量起, 且选择周边视网膜。

【关键词】 微脉冲/激光; 视网膜光凝; 损伤; 兔

An experimental study on micropulse diode laser lesions in rabbit retina

HE xiaojing, CHEN xueyi, QIAN yi, HU hanhua Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical College, Urumqi 830001, China

【Abstract】 Objective To study the biologic effect of micropulse diode laser on retinal lesions of rabbit eyes. **Methods** continuous-wave or micropulse diode laser was used to produce threshold retinal lesions or subthreshold retinal lesions in inferior retinal or upper retinal at random of every eye in eight pigmented rabbits (16 eyes). The fundus at shortly were observed by fundus fluorescein angiography. The histopathological alterations of retinal and choroids were also observed with light microscope and transmission electron microscope. **Results** The laser spots of subthreshold retinal lesions and leakage of fluorescein were undetectable. The retinal lesions were not be observed. While threshold retinal lesions were adverse. The retinal lesions were obvious and it showed reduction of outer nuclear layer cells. Condensed nuclei and cytoplasmic vacuolization were seen in the inner or outer nuclear layer. The hyperplasia of retinal pigment epithelial (RPE) was seen and no change was seen at Bruch membrane. **Conclusion** The micropulse diode laser technique did not destroy the retinal structure of the rabbits, but when we confirm the threshold energies from onset of lower energies. Moreover we should select acroteric zones of retina.

【Keywords】 micropulse/laser; retinal photocoagulation; lesions; rabbit

微脉冲激光是激光治疗的一个全新手段, 它是用短促调频的阈值下能量治疗视网膜病变, 可以获得与现有常规激光相同的治疗效果, 并能最大限度地减少对视网膜内层的损伤, 对保护光治疗眼的视力有重要意义。现在最常用的热源是 810nm 近红外半导体激光^[1]。目前国外已有的临床研究显示, 对各种原因引起的黄斑水肿、中心性浆液性脉络膜视网膜病变和玻璃膜疣等黄斑病变, 微脉冲激光治疗都是非常有效的方法。其中最常用于糖尿病黄斑水肿的治疗, 且治疗参数多用 5% 负载系数。(100~

300) mw 能量, 125 μ m 光斑^[2-4]。然而国内对其研究甚少, 我们通过对成年有色兔视网膜进行连续波阈值光凝及微脉冲激光阈下光凝, 观察激光后它们各自发生的形态学变化及视网膜损伤, 试图为微脉冲激光对人眼视网膜损伤提供实验参考。

材料和方法

1. 实验动物: 健康成年有色兔 8 只 16 眼, 体重 (1.8~2.2) kg, 雌雄不限, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 实验前双眼前节和眼底检查均正常。

2. 主要仪器: SLX810nm 半导体激光治疗仪 (美国 IRIS 公司), Topcon TRC-501X 眼底荧光造影仪 (日本 Topcon 公司), JEOL-JEM-1230 型透

作者单位: 830001 新疆医科大学第一附属医院眼科 (何晓静 陈雪艺 钱一); 新疆医科大学基础医学院科研中心 (胡汉华)

通讯作者: 陈雪艺, E-mail: hxj969@163.com

射电子显微镜 (日本 JEOL 公司), OLYMPUS 双目生物显微镜 (日本 Olympus 公司), LKB2188 型超薄切片机 (美国 Leica 公司)。

3. 方法:

(1) 激光方法: 用 0.25% 托吡卡胺滴眼液散瞳, 3% 戊巴比妥钠溶液按 1ml/kg 经兔耳缘静脉麻醉后, 角膜置广角眼底接触镜。以水平方向有髓神经纤维为界将视网膜分为上、下两区, 随机分配为阈值光凝区及微脉冲阈下光凝区, 并以视盘为标志, 距视盘 2PD 作 10 × 10 个光斑的光凝区, 光斑直径 200 μ m, 光斑间隔一个光斑距离, 曝光时间 0.2s。实验表明要得到可见的阈值反应强度的光斑, 810nm 激光所需能量为 130mw ~ 200mw, 由此可得 5% 负载系数、4 倍阈能量的阈下能量为 520mw ~ 800mw。

(2) 眼底观察: 光凝视网膜后即刻 (2h 内) 行眼底照相和眼底荧光造影, 观察光斑变化。

(3) 光镜切片: 光凝后 24h, 用空气栓塞法处死实验兔, 摘除眼球, 取出眼前节及玻璃体, 随机将 12 眼投入 10% 甲醛中固定, 按常规切片, HE 染色。

(4) 电镜切片: 切取其 4 眼光凝视网膜组织, 浸入 4% 的戊二醛液固定 24h 以上, 将组织切成 1mm × 2mm 的条块, 继续固定 24h, 再浸入 0.1mol/L 磷酸缓冲液中浸洗 30min, 用 1% 四氧化锇 1ml 固定 1.5h, 再用磷酸缓冲液 1.5ml 冲洗 15min, 用 50%、70%、90% 丙酮脱水各 15min, 100% 丙酮脱水 10min, 用 EPON812 环氧树脂包埋, 在 37 $^{\circ}$ C 温箱中过夜, 于 60 $^{\circ}$ C 温箱中放置 48h, LKB-2188 型切片机切取 1 μ m 厚的半薄切片, 定位后切取超薄切片, 铅—铀双重电子染色, 电镜观察超微结构变化。

结 果

1. 眼底照相和荧光造影观察: 微脉冲激光光凝兔眼视网膜后即刻, 眼底照相未见视网膜光凝斑, 眼底荧光造影显示光凝处无明显的荧光素渗漏; 而阈值光凝处眼底照相可见非常浅的灰白色光斑, 眼底荧光造影可见荧光素渗漏。

2. 光镜观察: 光镜下正常兔眼视网膜层次结构清晰, 感光细胞内外节排列整齐, 色素上皮层连续、规则 (图 1)。810nm 半导体连续波阈值光凝处视网膜即表现为光感受器细胞层受累, 外颗粒细胞数量减少, 内核层未见损伤, 色素上皮层连续性中断, 其下脉络膜血管充血 (图 2)。微脉冲激光光凝处视网膜略呈小丘状隆起, 但各层未见明显损伤, 仅见

脉络膜毛细血管、小静脉轻度充血 (图 3)。

3. 电镜观察: 正常兔眼视网膜外节排列整齐, 外核层排列紧密, 染色质分布均匀, 色素上皮细胞正常 (图 4)。810nm 半导体连续波阈值光凝后神经节细胞仅见轻微的内质网扩张; 内核层和内丛状层轻度的细胞内和细胞外水肿, 胞质中线粒体肿胀空泡变; 内核层和外核层均出现少量核固缩, 染色质呈团块状; 光感受器顶部微绒毛消失, 外节段变短, 失去正常的水平排列结构; 色素上皮层色素增生, 色素上皮细胞亦有肿胀呈空泡状; Bruch's 膜完整无损 (图 5)。而微脉冲激光光凝处神经节细胞、内核层及外核层变化不明显, 外节段排列轻微紊乱, 色素上皮细胞内轻微内质网扩张 (图 6)。

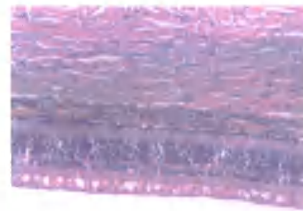


图 1 光镜正常视网膜层次结构清晰 HE × 400

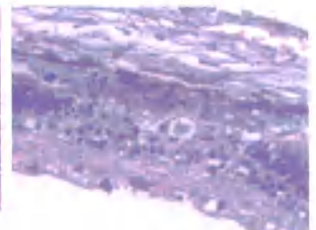


图 2 810nm 激光阈值光凝斑 HE × 400

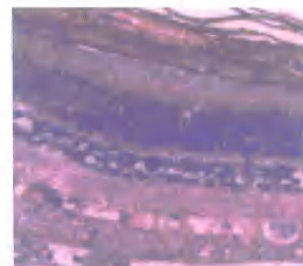


图 3 微脉冲激光阈下光凝斑 HE × 400

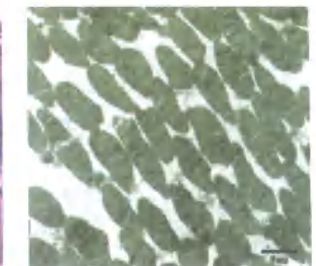


图 4 正常视网膜电镜下外节排列整齐 × 8000

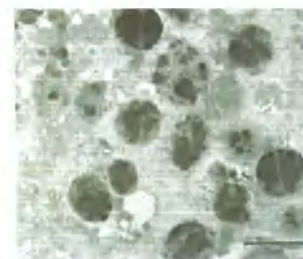


图 5 阈值光斑电镜下内核层细胞核固缩染色质呈团块状 × 500



图 6 微脉冲光斑电镜下外核层变化不明显图 × 10000

讨 论

由于黄斑区解剖结构及生理功能的特殊性, 决定了黄斑水肿治疗后不能有瘢痕增生和色素紊乱,

因此它的光凝治疗仅限于视网膜色素上皮 (RPE) 层, 利用激光热效应破坏失偿的 RPE 细胞并刺激其增殖形成新的脱色素的 RPE 细胞和新的血视网膜屏障。常规激光治疗黄斑水肿的作用已经确立, 但几乎所有病例, 视网膜上的光斑或多或少都能看到, 这种光凝可以导致光感受器的损伤^[5]。微脉冲半导体激光是一种选择性光凝的方法。已经证实, 在曝光时间不超过 100 μ s 的情况下, 微脉冲激光只对色素上皮细胞起作用, 因为在极短的时间内, 热量流动或从原照射区的热传递作用, 对光感受器或脉络膜毛细血管的影响很少。这种损伤被称为热量的原距离弥散^[6]。本实验中, 微脉冲激光光凝免视网膜后即刻, 眼底照相未见视网膜光凝斑, 眼底荧光造影显示光凝处无明显的荧光素渗漏, 说明光凝没有损伤到光感受器, 因为眼底镜下见到的光凝斑意味着光感受器组织凝固, 形成视网膜瘢痕, 而阈值光凝处眼底荧光造影可见荧光素渗漏, 这是激光曝光产生的 RPE 的分裂^[7], 破坏了色素屏障功能, 眼底照相可见非常浅的灰白色光斑, 说明阈值能量对色素上皮和光感受器都产生作用。

微脉冲半导体激光为 810nm 近红外激光, 叶黄素对其不吸收, 故格栅样光凝治疗黄斑水肿, 对视网膜损害极少。Dao-yi 等^[8]通过对激光光凝后的免视网膜内氧分配及耗氧量的测量研究, 提出视网膜损害依赖激光能量的大小, 虽然连续波和微脉冲激光后均可减少视网膜耗氧量、提高视网膜氧含量, 但就视网膜细胞的损害来说, 微脉冲激光具有更好的选择性, 比连续波安全范围更广。本实验分别从光镜和电镜两方面对激光光凝斑进行组织学观察后证实: 微脉冲激光光凝免视网膜后, 未见到视网膜光感受器损伤, 也未见到视网膜节细胞和神经纤维的损伤, 仅见外节段排列轻微紊乱, 色素上皮细胞内轻微内质网扩张, 而此变化均为可逆的。这与 Pollack 等^[9]的结果相一致。此结果提示, 在该参数下的微脉冲半导体激光光凝视网膜没有明显损伤视网膜组织, 是安全可行的。而在阈值能量下, 光凝处即表现为光感受器细胞层受累, 外颗粒层细胞数量减少, 色素上皮层连续性中断, 其下脉络膜血管充血。微细结构变化更明显, 损伤累及到神经上皮层, 且部分变化是不可逆的。因此, 在微脉冲治疗确定阈值能量时光斑一定要选在视网膜周边处, 避

免对黄斑区视力和视野的损伤。

研究表明, 传统激光光凝对脉络膜新生血管 (CNV) 有治疗作用, 但也会引起医源性 CNV 形成^[10]。CNV 的产生是由血—视网膜外层屏障破坏后单核细胞、细胞因子等血液成分渗入到视网膜下, 在局部使各种生长因子过度表达引起的缘故。由本实验可以看出微脉冲激光光凝没有引起医源性 CNV 的风险。阈能量光凝处 Bruch 膜完整, 虽不会形成 CNV, 但因为半导体激光光凝斑即刻反应要慢于常规激光, 本实验均在 20s~30s 后才观察到阈值光斑反应, 故阈能量尽可能从较低能量起, 否则就存在引起医源性 CNV 的风险。当然我们也可基于该理论使用超能量激光击穿 Bruch 膜以制作 CNV 的实验动物模型。

对于水肿视网膜的微脉冲半导体激光治疗应掌握什么样的光凝反应, 既能促进视网膜水肿的吸收, 又能将对视网膜组织的损害降到最低限度, 我们希望在此实验的基础上进一步扩大研究。

参考文献

- 1 Kim SY, Sanislo SR, Dalal R, et al. The selective effect of micropulse diode laser upon the retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37 (3): 779.
- 2 Laursen ML, Moeller F, Sander B, et al. Subthreshold micropulse diode laser treatment in diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88: 1173-1179.
- 3 Akduman L, Olk RJ. Subthreshold (invisible) modified grid diode laser photocoagulation in diffuse diabetic macular edema (DDME) [J]. *Ophthalmic Surg Lasers*, 1999, 30(9): 705.
- 4 Luttrull JK, Musch DC, Mainster MA. Subthreshold diode micropulse photocoagulation for the treatment of clinically significant diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89: 74-80.
- 5 Birngruber R, Gabel V-P, Hillenkamp F. Experimental studies of laser thermal retinal injury [J]. *Health Phys*, 1983, 44: 519-531.
- 6 Chong LP, Soriano D, Ramos AR. Sublethal laser damage to the retinal pigment epithelium by micro-pulse diode laser in primate eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37: 5694.
- 7 Roeder J, Michaud N, Flotte T, et al. Response of the RPE to selective photocoagulation of the RPE by repetitive short laser pulses [J]. *Arch Ophthalmol*, 1992, 110: 1786-1792.
- 8 Dao-yi Yu, Stephen J Cringle, Erming Su, et al. Laser-Induced changes in intraretinal oxygen distribution in pigmented rabbits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2005, 46: 988-999.
- 9 Pollack JS, Kim JE, Pulido JS, et al. Tissue effects of subclinical diode laser treatment of the retina [J]. *Arch Ophthalmol*, 1998, 116(12): 1633-1639.
- 10 Solberg Y, Rosner M, Turetz J, et al. MK-801 has neuroprotective and antiproliferative effects in retinal laser injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38: 1380-1389.

(收稿时间: 2007-07)